

⑯ BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑯ **Patentschrift**
⑯ **DE 2646854 C2**

⑯ Int. Cl. 4:

C08B 37/02

C 08 B 31/12

A 61 K 37/14

DE 2646854 C2

⑯ Aktenzeichen: P 26 46 854.2-42
⑯ Anmeldetag: 16. 10. 76
⑯ Offenlegungstag: 5. 5. 77
⑯ Veröffentlichungstag der Patenterteilung: 3. 5. 89

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑯ Unionspriorität: ⑯ ⑯ ⑯
22.10.75 CA 238305

⑯ Patentinhaber:
Hematech, Inc., Toronto, Ontario, CA

⑯ Vertreter:
Dahlke, W., Dipl.-Ing.; Lippert, H., Dipl.-Ing.,
Pat.-Anwälte, 5060 Bergisch Gladbach

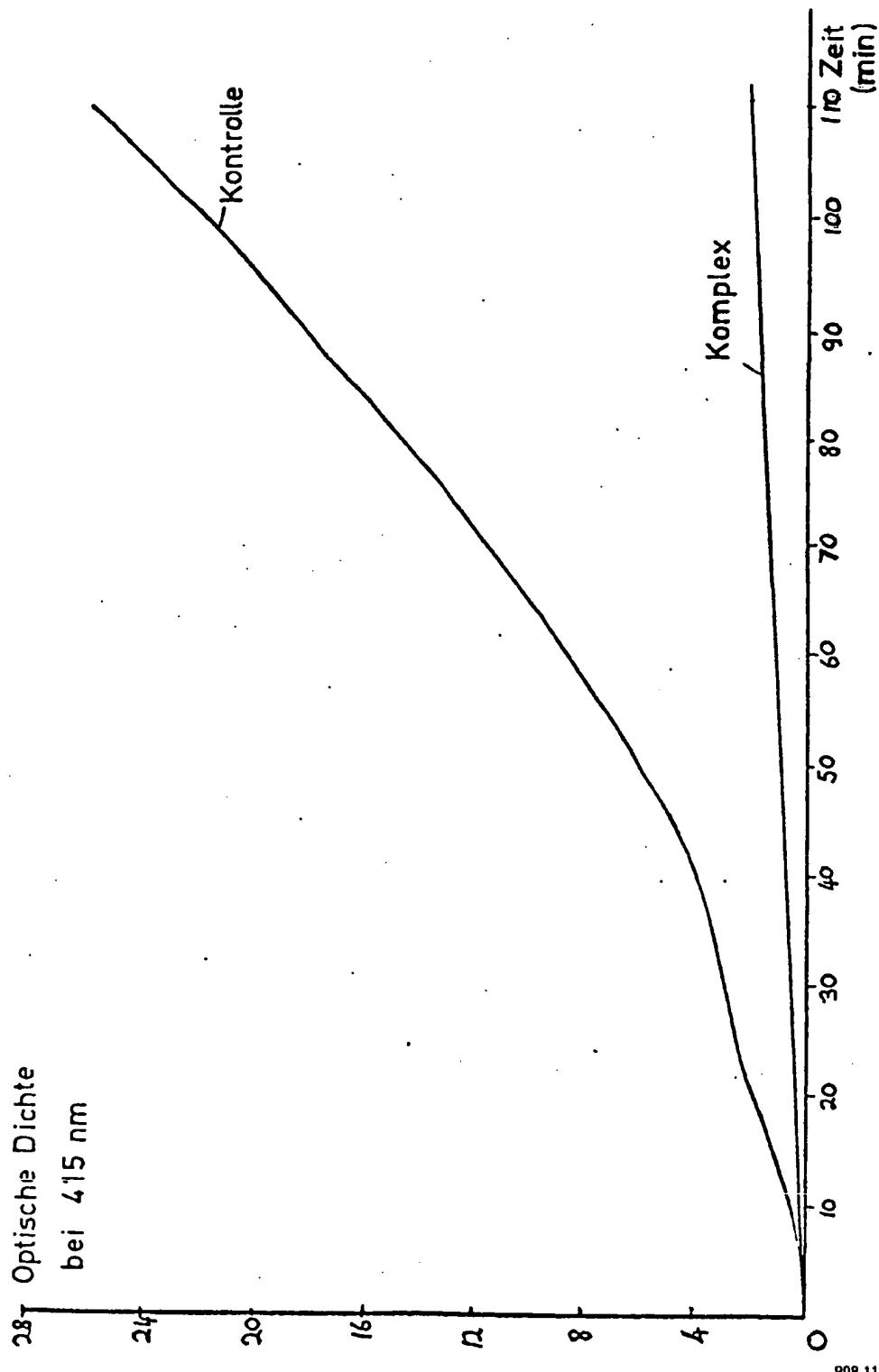
⑯ Erfinder:
Wong, Jeffrey Tze-Fei, Prof., Don Mills, Ontario, CA
⑯ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit
in Betracht gezogene Druckschriften:
C.A.73,1970,53/13y;

⑯ Makromolekulare wasserlösliche Verbindung, Verfahren zur Herstellung einer solchen Verbindung sowie Mittel
zur Verwendung als Blutersatz oder Blutstrekker

DE 2646854 C2

ZEICHNUNGEN BLATT 1

Nummer: 28 48 854
Int. Cl. 4: C 08 B 37/02
Veröffentlichungstag: 3. Mai 1989



Beschreibung

Die Erfindung betrifft eine makromolekulare wasserlösliche Verbindung als Blutersatz bei Lösung oder Suspension in Wasser, ein Verfahren zur Herstellung einer solchen makromolekularen wasserlöslichen Verbindung sowie ein Mittel zur Verwendung als Blutersatz oder Blutstrekker zum Verabreichen an Menschen- oder Tierpatienten in Form einer wässrigen Lösung oder einer Suspension eines wasserlöslichen makromolekularen, Sauerstoff transportierenden Stoffes.

Wegen der schnell steigenden Bedarfs an Blut mit der Ausweitung von medizinischen Behandlungen besteht ein Bedarf zur Entwicklung von Blutersatz und zum effektivsten Gebrauch von verfügbaren Blutvorräten. Dieser Bedarf besteht sowohl in Bereichen, in denen fortgeschrittene medizinische Behandlungsmethoden praktiziert werden, als auch in Bereichen, in denen kostspielige Einrichtungen zur Blutkonservierung und Typisierung nicht verfügbar sind.

Die verschiedensten Substanzen sind schon als Blutersatz vorgeschlagen worden, beispielsweise Dextrangelatin, Polyvinylpyrrolidon und Perfluor-Verbindungen wie Perfluortributylamin. Diese haben entweder unbefriedigende Sauerstoffbindeigenschaften oder unerwünschte oder unbekannte Nebeneffekte. G. Ya. Rozenberg beschreibt in Probl. Gemtol. Pereliv. Krövi 1970, 15(4), S. 12-20 Blutersatzstoffe wie Dextran und modifiziertes Hämoglobin.

Hämoglobinlösungen sind ebenfalls versucht worden. Hämoglobin ist ein komplexes Proteinmaterial, das Eisenmoleküle enthält, welche einen Großteil von roten Blutkörperchen bei Wirbeltieren bilden. Die Verwendung einer Hämoglobinlösung anstelle von Blut überwindet das Blutgruppenproblem. Hämoglobin ist einfacher als Blut zu lagern. Hämoglobin läßt sich von Blut (tierisch oder menschlich) isolieren und zur Konservierung viel länger als Blut gefriertrocknen.

Hämoglobin wird jedoch schnell aus der Niere im Urin vom kranken Patienten ausgeschieden. Häufige massive Transfusionen von Hämoglobinlösung müssen deshalb erfolgen, und das hohe Maß an Ausscheidung stellt eine potentielle Gefahr für Patienten mit vorher bestehender Nierenkrankung dar. Es ist berichtet worden, daß die Halbwangszeit aus dem Kreislauf von durch Transfusion verabreichtem Hämoglobin nur anderthalb Stunden bei Affen beträgt.

Die schnelle Ausscheidung von Hämoglobin bei Verabreichung als Lösung dürfte mindestens teilweise auf sein Molekulargewicht zurückzuführen sein. Hämoglobin hat ein Molekulargewicht von etwa 65.000, was offenbar nicht hoch genug ist, um dessen Beibehaltung im Kreislaufsystem für eine angemessene Zeitdauer zu ermöglichen, wenn es getrennt von roten Blutkörperchen und Plasma zugeführt wird.

Aufgabe dieser Erfindung ist es, einen Blutersatzstoff zu schaffen, dessen reversible Sauerstofftransportfähigkeit mit der von an rote Blutkörperchen gebundenem Hämoglobin vergleichbar ist, dessen Molekulargewicht so hoch ist, daß die Verweilzeit im Körper von Menschen oder Tieren verlängert ist, und das biologisch verträglich ist.

Diese Aufgabe wird gelöst durch die makromolekulare wasserlösliche Verbindung gemäß Anspruch 1, das Verfahren zur Herstellung einer makromolekularen wasserlöslichen Verbindung nach Anspruch 2 und das Mittel zur Verwendung als Blutersatz oder Blutstrekker nach Anspruch 3.

Die erfindungsgemäße Verbindung wird in angemessener Weise im Körper beibehalten. Die Verbindung gemäß der Erfindung hat eine reversible Sauerstofftransportfähigkeit und ist offensichtlich auch sonst biologisch akzeptabel. Das zur Herstellung der Verbindung verwendete modifizierte Dextran hat ein durchschnittliches Molekulargewicht von etwa 20.000 bis 275.000, während die modifizierte Hydroxyethylstärke ein durchschnittliches Molekulargewicht von etwa 20.000 bis etwa 2.000.000 hat. Vorzugsweise wird ein Molekulargewicht von etwa 20.000 bis 70.000 gewählt. Innerhalb solcher Molekulargewichtsbereiche geht eine chemische Bindung mit Hämoglobin schnell vorstatten, und die Reaktionslösungen haben geeignete Viskositäten zur leichten Handhabung. Dextrane mit einem Molekulargewicht von unter 90.000 sind als im wesentlichen nicht allergieerzeugend bekannt, und sie sind deshalb zur Verwendung im erfindungsgemäßen Zusammenhang wünschenswert.

Das Reaktionsprodukt aus dem modifizierten Polysaccharid und Hämoglobin kann eine 1:1-Bindung sein, oder es können z. B. bis zu 9 Moleküle des Hämoglobins an einem Molekül des modifizierten Polysaccharids gebunden sein. Das kann durch die relativen Mengen an Ausgangsstoffen für die Umsetzung und durch die Kontrolle anderer Reaktionsbedingungen wie der Zeit, der Temperatur und des pH-Wertes bestimmt werden. Die Verbindungen gemäß der Erfindung haben Molekulargewichte im Bereich von etwa 70.000 bis 2.000.000 und vorzugsweise im Bereich von etwa 85.000 bis 135.000.

Die Verbindung ist ein Hämoglobin-Polysaccharid-Komplex und kann nach ihrer Bildung in einem physiologisch akzeptablen wässrigen Träger fertig zur Verabreichung an einen Patienten gewonnen oder gewonnen und in einem solchen Träger wieder aufgelöst werden.

Bei dem Verfahren zur Herstellung des erfindungsgemäßen Produkts erfolgt die chemisch covalente Bindung mindestens eines Hämoglobin-Moleküls mit einem Polysaccharid-Molekül. Die Reaktion wird am besten in zwei Hauptschritten durchgeführt. Im ersten Schritt wird ein modifiziertes Polysaccharid gebildet, das chemische Gruppen enthält, die zur chemischen Wechselwirkung mit den Seitengruppen des Hämoglobins in der Lage sind. Beim zweiten Schritt wird das modifizierte Polysaccharid zur Reaktion mit den Seitengruppen des Hämoglobins gebracht, um den covalent gebundenen Komplex gemäß der Erfindung entstehen zu lassen.

Beim ersten Verfahrensschritt tritt das Polysaccharid in Reaktion mit einem Reagensmittel, das eine chemische Gruppe hat, die mit den Hydroxyl-Gruppen am Polysaccharid in Reaktion tritt (z. B. Carbonsäure-, Acylhalogenid-, Alkyhalogenid-, Amido-, Hydrazin-, Isocyanat- oder Amino-Gruppen, die mit den Hydroxylgruppen in Gegenwart eines Aktivators wie Cyanogenbromid oder Perjodat in Reaktion tritt). Darüberhinaus muß dieses Reagensmittel in der Lage sein, dem Polysaccharid Gruppen anfügen zu können, die anschließend mit Hämoglobin oder mit einer überbrückenden Verbindung, die anschließend mit Hämoglobin in Reaktion treten kann,

PS 26 46 854

reagieren können. Methoden und Reaktionsmittel zum Modifizieren von Polysacchariden durch chemische Umsetzung der Hydroxylgruppen sind bekannt.

Beim zweiten Verfahrensschritt wird das modifizierte Polysaccharid mit Hämoglobin zur Bindung damit zur Reaktion gebracht, und zwar durch Reaktion von funktionalen Seitengruppierungen am Hämoglobin mit den Gruppen, die an das modifizierte Polysaccharid im ersten Schritt angefügt worden sind. Hämoglobin ist ein Protein und enthält als funktionale Seitengruppierungen Amino-, Phenol-, Mercapto-, Methylmercapto-, Imidazo-, Carboxyl- und Guanidino-Gruppen, die von Aminosäurebestandteilen abgeleitet sind.

Chemische Gruppen, die sich mit diesen reaktiven Proteinseitengruppierungen umsetzen können und die deshalb beim ersten Verfahrensschritt in das Polysaccharid eingebracht werden können, sind in der Proteinchemie bekannt — siehe z. B. "Chemical Modification of Proteins" von Means & Freeney, herausgegeben von Holden-Day, 1971, und "Advances in Carbohydrate Chemistry", Band 29, Tipson und Hortsen, herausgegeben von Academic Press, Kapitel von Kennedy über Polysaccharid-Derivate. Zu den Beispielen gehören:

Acylierende Gruppen, z. B. Säureanhydrid, N-Acylimidazol, Säureazid, N-Carboxyanhydrid, Diketen, Dialkylpyrocarbonat, Imidoester, O-Alkylisoharnstoff, S-Alkyl-Isobarnstoff, Sulfonylhalogenid, Sulfonatester und carbodiimid-aktivierte Carboxylgruppen.

Von diesen ist bekannt, daß sie mit Aminogruppen an Proteinen reagieren und covalente Bindungen entstehen lassen, bei denen Acyl- oder ähnliche Bindungen vorhanden sind;

Alkylierende Gruppen, die mit Sulfhydryl- (Mercapto), Thiomethyl-, Imidazo- oder Aminogruppen am Protein reagieren, wie z. B. Halocarboxyl-, Maleimid aktivierte Vinyl-, Ethylenimin-, Arylhalogenid-Gruppen, 2-Hydroxy-5-Nitrobenzylbromid, aliphatische Aldehyd- und Ketongruppen mit Reduktionsmitteln (die mit der Aminogruppe des Proteins reagieren);

Ester- und Amid-bildende Gruppen wie Diazocarboxylat und Carbodiimid- und Aminogruppen zusammen, die mit COOH am Protein reagieren;

Disulfid-bildende Gruppen, die mit den Sulfhydrylgruppen am Protein reagieren, wie 5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoat)-Gruppen und Alkylmercaptangruppen (die mit den Sulfhydrylgruppen am Protein in Gegenwart von Oxidationsmitteln wie Jod reagieren);

Dicarbonylgruppen wie Cyclohexandiongruppen und andere 1,2-Diketongruppen, die mit den Guanidino-Gruppen von Protein reagieren;

Diazogruppen, die mit Phenolgruppen am Proteinmolekül reagieren;

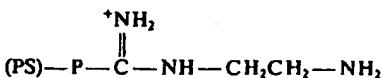
Reaktionsgruppen aus der Reaktion von Cyanbromid mit dem Polysaccharid, die mit Aminogruppen am Protein reagieren;

Vorzugsweise wird ein modifiziertes Polysaccharid mit Gruppen erzeugt, die mit Mercaptogruppen des Hämoglobin reagieren. Besonders bevorzugte Gruppen sind die Halocarboxylatgruppen.

Spezielle Beispiele von bevorzugten Methoden zur Herstellung des Komplexes gemäß der Erfindung sind wie folgt:

Methode 1:

Das Polysaccharid (PS) wird zunächst mit Cyanbromid CNBr zur Umsetzung gebracht, wobei sich ein aktiviertes Zwischenprodukt bildet, das mit Diaminoethan reagiert, so daß die folgende Verbindung entsteht:

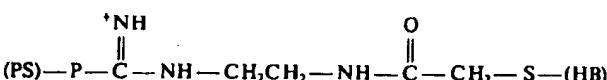


Aminoethyl-Isoureido-Polysaccharid.

Die Bindung zwischen der Ethylgruppe und Dextran ist mit größter Wahrscheinlichkeit eine Isoharnstoffbindung, obgleich andere Arten chemischer Bindungen nicht völlig ausgeschlossen werden. Das auf diese Weise erhaltene Aminoethyl-Isoureido-Dextran wird dann durch Bromacetylchlorid acyliert, um Bromacetyl-Aminoethyl-Isoureido-Polysaccharid entstehen zu lassen:



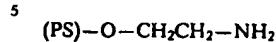
Dieses wiederum reagiert mit den Mercaptogruppen von Hämoglobin (HB), um Hämoglobin-S-Acetylaminoethyl-Isoureido-Polysaccharid zu bilden:



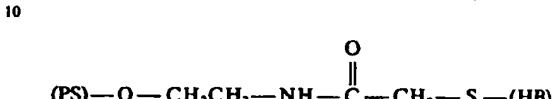
PS 26 46 854

Methode II:

Das Polysaccharid (PS) wird zunächst mit 2-Chlorethylamin zur Umsetzung gebracht, um Aminoethyl-O-Polysaccharid zu bilden:

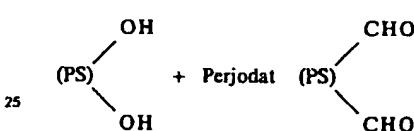


Ähnlich wie bei der Methode I entsteht durch eine sukzessive Reaktion mit Bromacetylchlorid und Hämoglobin (HB) Hämoglobin-S-Acetylaminooethyl-O-Polysaccharid:

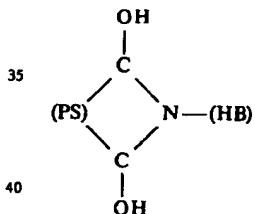


Methode III:

Das Polysaccharid (PS) wird mit Natriumperjodat zur Reaktion gebracht, um den Dialdehyd zu bilden:



30 Die Reaktion zwischen dem Dialdehyd und den Aminogruppen von Hämoglobin (HB) ergibt Hämoglobin-N-Dextran:



40 Durch richtige Einstellung der Bedingungen, unter denen das modifizierte Polysaccharid mit dem Hämoglobin zur Reaktion gebracht wird, lässt sich eine Ausbeute von mehr als 90% gebundenen Komplexprodukts erhalten, was die Trennung des Produkts von Rückstand-Reaktionsmitteln unnötig macht. Wenn das modifizierte Polysaccharid beispielsweise N-Bromacetyl-Aminoethylisoureido-Dextran (Br-Dextran) ist, das nach der vorstehend beschreibung hergestellt worden ist, können die Konzentrationen des Hämoglobins und von Br-Dextran in der Bindungs-Reaktionsmittellösung und die Reaktionszeit eingestellt werden, um Ausbeuten von mehr als 90% gebundener Produkte zu liefern. Eine zu hohe Konzentration von Reaktionspartnern führt zur Gelierung der Reaktionsmischung und zur Bildung eines quervernetzten Produkts mit einem übermäßig hohen Molekulargewicht, was gewöhnlich unerwünscht ist. Vorzugsweise wird ein Mol-Verhältnis von Br-Dextran zu Hämoglobin benutzt, das nahe bei 1:1 liegt oder das unter 1:1 liegt, wenn ein Dextran mit hohem Molekulargewicht benutzt wird. Die Bildung eines quervernetzten Produkts lässt sich auch durch Senken des pH-Werts unterbinden, um die 45 Alkylierungsreaktion zu stoppen, oder durch Zusetzen von Mercaptoäthanol oder Cystein, die mit dem Br-Dextran in Konkurrenz zu den Hämoglobin-Mercaptogruppen bei der Umsetzung treten.

Beispiel 1

60 Herstellung des Dextran-Hämoglobin-Komplexes

0,3 g Cyanbromid wird in 3 ml Acetonitril aufgelöst und 100 ml 2%iger Dextranlösung (Molekulargewicht 200.000) zugesetzt. Der pH-Wert wird auf 10,8 mit 1 M NaOH für die Dauer von 5 Minuten gehalten. Dann werden 2 ml Diaminoäthan zugegeben. Der pH-Wert wird auf 9,5 mit konzentrierter HCl eingestellt, und dieses 65 Reaktionsgemisch lässt man über Nacht stehen.

Das Gemisch wird gründlich gegen destilliertes Wasser dialysiert und gefriergetrocknet. Das gefriergetrocknete Aminodextran kann lange Zeit gelagert werden.

Alles aktivierte Dextran, das gewonnen worden ist (1,6 bis 1,7 g), wird in 50 ml 0,1 Phosphat-Pufferlösung,

PS 26 46 854

pH-Wert 7,0, aufgelöst, und 2 ml Bromacetyl-bromid werden sehr langsam zugegeben, und zwar unter heftigem Umrühren für die Dauer von 2 Stunden. Der pH-Wert wird konstant auf 7,0 durch die Zugabe von 1 M NaOH gehalten. Wenn die Reaktion beendet ist, wird das Gemisch gründlich gegen destilliertes Wasser dialysiert und dann gefriergetrocknet. Man erhält 1,4 g bromiertes Dextran bzw. Br-Dextran.

1 g Br-Dextran wird 30 ml einer 2 bis 3%igen Lösung menschlichen Hämoglobins in 0,1 M Natriumbicarbonat-Pufferlösung, pH-Wert 9,5, zugegeben, und die Reaktion läßt man über Nacht vorstatten gehen.

Dextran-Hämoglobin und freies Hämoglobin werden an einer Sephadex-G-200®-Säule voneinander getrennt. Die Ausbeute von Dextran-Hämoglobin beträgt 70 bis 80% des gesamten zugesetzten Hämoglobins.

Beispiel 2

5

10

Nierenausscheidung von Hämoglobin und Dextran-Hämoglobin durch Ratten

Um die Wirksamkeit des Komplexes gemäß der Erfindung als Blutersatz zu testen, wurden 3 ml einer 2%igen Dextran-Hämoglobin-Komplexlösung, die nach Beispiel 1 hergestellt worden war, in eine Wistar-Ratte infundiert, und die Menge an vom Tier ausgeschiedenem Dextran-Hämoglobin wurde durch Waschen der Blase mit einem ständigen Strom physiologischer Sole und durch Messen der Menge an aufgelöstem Hämoglobin in der Spülung als eine Funktion der Zeit geschätzt. Ein genau gleiches Kontrollexperiment wurde durchgeführt, außer daß 3 ml einer 2%igen Hämoglobinlösung benutzt wurden. In beiden Fällen wurde der Hämoglobin gehalt spektrophotometrisch in Einheiten der optischen Dichte bei 415 nm bestimmt.

Die Ergebnisse sind graphisch in der beigefügten Darstellung gezeigt. Es handelt sich dabei um eine graphische Wiedergabe der optischen Dichte, bezogen auf die Zeit, für die jeweiligen Experimente. Wie zu sehen ist, ist die Ausscheidungsrate von Hämoglobin viel höher als die Ausscheidungsrate des Dextran-Hämoglobin-Komplexes.

Dieses Experiment demonstriert, daß Dextran-Hämoglobin potentiell ein viel brauchbarer Blutersatz als freies Hämoglobin bezüglich seiner wesentlich besseren Rückbehaltung durch das Tier gegen eine Nierenausscheidung ist.

Beispiel 3

15

20

25

30

35

40

45

50

55

2 g Dextran mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 110.000 wurden in 75 ml destilliertem Wasser aufgelöst, der pH-Wert wurde auf 10,8 mit 2 M NaOH eingestellt, und diesem wurde 0,3 g Cyanbromid, aufgelöst in 3 ml Acetonitril, unter Umrühren bei Raumtemperatur zugesetzt. Der pH-Wert wurde 5 Minuten lang durch Zusetzen von 2 M NaOH auf 10,8 gehalten. Der pH-Wert wurde dann auf etwa 2,0 bis 2,5 mit konzentrierter HCl eingestellt, und die Lösung wurde eine weitere Minute lang umgerührt. 3 ml Diaminoäthan wurden zusammen mit zusätzlicher HCl zugegeben, um zu verhindern, daß der pH-Wert 9,5 überschreitet. Der endgültige pH-Wert wurde auf 9,5 eingestellt. Die Lösung wurde über Nacht bei 4°C umgerührt. Das entstandene Aminoethylamino-Dextran wurde in einem Bio-Faser-50%-Becher gegen entionisiertes Wasser dialysiert, bis durch Ninhydrin kein freies Amin in dem Dialysat nachgewiesen werden konnte. Die dialysierte Lösung wurde lyophilisiert, um ca. 1,6 g getrocknetes Aminoethylamino-Dextran zu liefern. Das wurde in 50 ml 0,1 M Phosphat-Pufferlösung mit einem pH-Wert von 7,0 aufgelöst, und 3 ml Bromacetyl-bromid wurden durch eine Pasteur-Pipette mit einer fein gezogenen Kapillaren spitze während einer Zeitspanne von 60 Minuten zugesetzt. Während der gesamten Zeit wurde die Lösung heftig in einem Eiswasserbad umgerührt und auf einem pH-Wert von 6,6 bis 6,8 mittels eines pH-Regelgerätes durch Zugabe von 2 M NaOH-Lösung, während der Zugabe von Bromacetyl-bromid, gehalten. Danach wurde die Lösung gegen entionisiertes Wasser dialysiert, bis in dem Dialysat durch Silbernitrat kein freies Brom nachgewiesen werden konnte. Ca. 1,5 g Br-Dextran wurden bei der Lyophilisierung erhalten. Das Experiment wurde unter Verwendung von anderen Dextrans mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 110.000, 70.000, 40.000 und 20.000 wiederholt. Der Bromgehalt der verschiedenen synthetisierten Br-Dextrane wurde durch Elementenanalyse bestimmt, er lag im Bereich von 9–11 Glucoserenen pro Bromatom.

Das in dieser Weise gebildete Br-Dextran wurde an Hämoglobin gebunden, indem eine vorgeschriebene Menge in 6 ml Hämoglobinlösung aufgelöst wurde (die 2,5, 5 oder 10% Hämoglobin in 0,1 M Natriumbicarbonat, pH-Wert 9,5, enthielt). Die Reaktion wurde unter ständigem Umrühren bei 4°C vorstatten gehen gelassen. Die Ausbeute an Reaktionsprodukten wurde durch Durchgleiten des Reaktionsgemisches durch eine Sephadex-G-150®-Säule mit einer 0,05 M-Phosphat-Pufferlösung, pH-Wert 7,5, bestimmt. Der Hämoglobin gehalt wurde durch Absorption bei vorgeschriebenen Wellenlängen bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 angegeben.

Diese Ergebnisse zeigen, daß mit jedem Dextran über 90% Ausbeuten von Reaktionsprodukt durch geeignete Wahl von Experimentbedingungen erhalten werden können.

Beispiel 4

60

Herstellung von Dextran-Hämoglobin-Komplex durch Methode II

65

1 g Dextran (Molekulargewicht 40.000) wurde gründlich mit 1 ml Chloreythylamin gemischt, das als die obere Phase nach einer Zugabe konzentrierten NaOH zu Chloreythylaminhydrochlorid erhalten wurde. Das Gemisch wurde mit 0,4 ml konzentrierten NaOH weiter gemischt, in eine verschlossene Röhre gesetzt und bei 120°C eine Stunde lang im Autoklaven behandelt. Dann wurde 1 ml Chloreythylamin und 0,4 ml konzentrierte NaOH zugesetzt, und das Gemisch wurde wiederum eine Stunde lang bei 120°C im Autoklaven behandelt. Das wurde

PS 26 46 854

noch einmal wiederholt. Nach dem Kühlen wurde das Gemisch gründlich gegen destilliertes Wasser dialysiert und schließlich in 11 ml 0,1 M Phosphat-Pufferlösung gegeben, pH-Wert 6,8.

Diese Lösung aus Aminoethyl-O-Dextran wurde mit langsamer Zugabe von 0,5 ml Bromacetylchlorid während einer Zeit von etwa einer Stunde acyliert. Sie wurde gegen destilliertes Wasser gründlich dialysiert und gefriergetrocknet.

5 0,1 g des gefriergetrockneten Bromacetyl-Aminoethyl-O-Dextrans wurde 1,7 ml 5% menschlichen Hämoglobins in 0,1 M Natriumbicarbonat-Pufferlösung, pH-Wert 9,5, zugesetzt und 48 Stunden lang auf 4°C gehalten.

Die Chromatographie an Sephadex® zeigte, daß über 90% des Hämoglobins in der Form von Dextran-Hämoglobin gebunden war.

10

Beispiel 5

Herstellung von Dextran-Hämoglobin-Komplex nach Methode III

15 1 ml einer 12%igen wäßrigen Lösung Natriumperjodat wurde 10 ml einer 10%igen wäßrigen Lösung Dextran zugegeben, und das Gemisch ließ man über Nacht im Dunkeln bei 4°C stehen. Eine 3%ige Natriumbisulfatlösung wurde zugegeben, bis das Gemisch braun wurde, und dann, wiederum, farblos. Das Gemisch wurde gegen destilliertes Wasser dialysiert, um die Dextran dialdehyd-Lösung zu gewinnen. Es wurden dann 2 Volumenteile 3%igen stromafreien Hämoglobins zu 0,3 M Natriumbicarbonat-Pufferlösung, pH-Wert 9,5, zugesetzt. Die

20 Bindung von Hämoglobin an Dextran erfolgte bei 4°C über Nacht. Der entstandene Dextran-Hämoglobin-Komplex wurde von nicht-gebundenem Hämoglobin durch Chromatographie mit einer Sephadex-G-200®-Säule getrennt. Man erhielt eine Ausbeute von ca. 60% gebundenen Produkts.

Beispiel 6

25

Nierenausscheidung von Hämoglobin und Dextran-Hämoglobin durch Kaninchen

Männliche Kaninchen mit Körpergewichten von 3,3 bis 3,5 kg wurden mit 0,1 g Natriumpotassium narkotisiert. Eine Lösung Hämoglobin oder Dextran-Hämoglobin (Molekulargewicht von Dextran: 200.000 bis 275.000) gemäß der Erfahrung in einer Standard-Nierendialyse-Pufferlösung (nach Rabiner et al, 1967, J. Exp. Med. 126, 1127 – 1142) mit einem Gehalt von 20 µCi (Mikro-Curie) ³H-Methoxyinulin, wurde in jedes Tier durch die Randohrader mit 1,1 ml/Minute infundiert. Nach dem Infundieren der Lösung wurde die Infusion mit der gleichen Geschwindigkeit mit der Pufferlösung fortgesetzt, um den urinären Ausgang beizubehalten. In Intervallen wurde die Blase mit drei 5-ml-Partien 0,9%iger Sole unter Verwendung eines Katheters Foley® No. 8 (3 ml) ausgespült, und nach einem Schleudern bei 3.000 g für die Dauer von 10 Minuten zum Entfernen eventuellen absetzbaren Materials wurde das aufgelöste Hämoglobin oder Dextran-Hämoglobin in den kombinierten Spülungen auf der Basis der Absorption bei 576 nm bestimmt. Der ³H-Inulingeinhalt in den kombinierten Spülungen wurde durch Szintillationszählung mit einer Korrektur für die Unterdrückung durch Hämoglobin gemessen; ein Fremdstrahlungsstandard im Chicago-Mark-II-Nuklearzähler wurde zum Bestimmen der Unterdrückung benutzt. Die Plasmakonzentration von Hämoglobin oder Dextran-Hämoglobin wurde zu verschiedenen Zeiten durch Abnehmen von Blutproben aus der Halsschlagader und Durchführung von Absorptionsmessungen mit den Proben bei 576 nm nach Sedimentierung der Erythrozyten bestimmt.

Tests wurden unter Verwendung von 50-ml- oder 30-ml-Proben von 1%igem Hämoglobin oder Dextran-Hämoglobin durchgeführt, das das Äquivalent von 1% Hämoglobin enthielt.

45 Es ist festgestellt worden, daß das Dextran-Hämoglobin, besonders das, das durch die Methode nach Beispiel 1 und 3 hergestellt worden ist, durch die Nieren in einer wesentlich geringeren Geschwindigkeit ausgeschieden wird und aus dem Kreislauf wesentlich langsamer entfernt wird als freies Hämoglobin, obwohl die Nierenfunktion bei den Tieren, die mit Dextran-Hämoglobin infundiert wurden, wie durch Inulin-Exkretion nachgewiesen, unbeeinträchtigt war. Ferner wurde seitdem wiederholt beobachtet, daß bei verschiedenen Tieren und mit verschiedenen Infusionsdosierungen dieses ungleiche physiologische Verhalten von Dextran-Hämoglobin und freiem Hämoglobin auf die unterschiedliche Natur der Substanzen zurückzuführen ist, nicht auf irgendeine Änderung beispielsweise im Bluthaptoglobininhalt der Versuchstiere.

Die Sauerstoffbinde-eigenschaften von Produkten gemäß der Erfahrung werden durch die Methode von Benesch et al (1965) Anal. Biochem. 11, 81, 87 bestimmt. Es ist festgestellt worden, daß im Vergleich zu Hämoglobin die Produkte gemäß der Erfahrung dazu neigen, eine etwas größere Affinität auf Sauerstoff zu zeigen, die essentielle Sauerstofftransport- und Lösefähigkeit von Hämoglobin jedoch bewahren. Wie durch die Halbsättigungs-Sauerstoffspannung gemessen, zeigt der Dextran-Hämoglobin-Komplex, der nach der vorstehend beschriebenen Methode I hergestellt worden ist, eine etwa 2,5-fache größere Affinität für Sauerstoff im Vergleich zu freiem Hämoglobin. Die Sauerstoffaffinität des Komplexes kann durch geeignete chemische Behandlung des Hämoglobins geändert werden, und zwar vor oder nach der Bindung mit dem Polysaccharid, beispielsweise durch Reaktion desselben mit Pyridoxalphosphat und durch Reduktion mit Natriumborohydrid.

65

PS 26 46 854

Tabelle 1

| Dextran Molekulargewicht | % Br-Dextran in Reakt.-m. Sol ⁿ | % Hämoglobin in Reakt.-m. Sol ⁿ | Molverh. Dextran/ Hämoglobin | Reakt.- zeit (h) | Viskos. (mm ² /s) | % Ausbeute gebunden. Produkt | 5 |
|-----------------------------|--|--|------------------------------------|------------------------|---------------------------------|------------------------------------|----|
| 200 000 | 3,33 | 5,0 | 0,21 | 24 | 35,19 | 96 | |
| 200 000 | 3,33 | 5,0 | 0,21 | 48 | 9,86 | 97 | 10 |
| 200 000 | 3,33 | 2,5 | 0,43 | 24 | 7,56 | 92 | |
| 200 000 | 1,66 | 5,0 | 0,11 | 24 | 8,47 | 96 | |
| 200 000 | 1,66 | 5,0 | 0,11 | 48 | 20,94 | 95 | |
| 110 000 | 3,33 | 5,0 | 0,39 | 24 | 45,29 | 97 | |
| 110 000 | 3,33 | 5,0 | 0,39 | 48 | 7,39 | 93 | |
| 110 000 | 3,33 | 5,0 | 0,39 | 72 | 8,07 | 95 | |
| 110 000 | 3,33 | 2,5 | 0,78 | 24 | 7,43 | 97 | 15 |
| 110 000 | 1,66 | 5,0 | 0,19 | 24 | 6,43 | 85 | |
| 110 000 | 1,66 | 5,0 | 0,19 | 48 | 19,40 | 99 | 20 |
| 110 000 | 1,66 | 5,0 | 0,19 | 72 | 6,72 | 98 | |
| 70 000 | 3,33 | 5,0 | 0,61 | 24 | 5,81 | 87 | |
| 70 000 | 3,33 | 2,5 | 1,22 | 24 | 6,49 | 94 | |
| 70 000 | 1,66 | 5,0 | 0,31 | 24 | 6,90 | 96 | |
| 70 000 | 1,66 | 5,0 | 0,31 | 48 | 15,37 | 83 | 25 |
| 40 000 | 3,33 | 10,0 | 0,54 | 24 | 20,10 | 90 | |
| 40 000 | 3,33 | 10,0 | 0,54 | 48 | 22,65 | 94 | |
| 40 000 | 3,33 | 10,0 | 0,54 | 72 | 6,32 | 96 | |
| 40 000 | 3,33 | 5,0 | 1,07 | 24 | 4,14 | 99 | |
| 40 000 | 3,33 | 2,5 | 2,15 | 24 | 4,29 | 92 | 30 |
| 40 000 | 1,66 | 5,0 | 0,54 | 72 | 8,91 | 97 | |
| 20 000 | 3,33 | 10,0 | 1,07 | 48 | 10,24 | 98 | |
| 20 000 | 3,33 | 10,0 | 1,07 | 72 | 3,07 | 94 | |
| 20 000 | 1,66 | 5,0 | 1,07 | 72 | | | |

Patentansprüche

1. Makromolekulare wasserlösliche Verbindung als Blutersatz bei Lösung oder Suspension in Wasser, gekennzeichnet durch die allgemeine Formel

(PS)-X-HB,

in der (PS) ein modifiziertes Polysaccharid darstellt, das entweder Dextran mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von etwa 20.000 bis 275.000 oder Hydroxyethylstärke mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von etwa 20.000 bis etwa 2.000.000 ist, HB Hämoglobin darstellt und X eine kovalent gebundene chemische Brücke ist, die entweder durch Umsetzung von Bromacetylaminooethyl-Seitengruppen des Polysaccharids mit Mercapto-Gruppen des Hämoglobins oder durch Umsetzung von Dialdehyd-Seitengruppen des Polysaccharids mit Aminogruppen des Hämoglobins gebildet ist.

2. Verfahren zur Herstellung einer makromolekularen wasserlöslichen Verbindung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein Polysaccharid, das entweder Dextran mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von etwa 20.000 bis 275.000 oder Hydroxyethylstärke mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von etwa 20.000 bis etwa 2.000.000 ist, in jeweils an sich bekannter Weise chemisch modifiziert wird durch Einbringen von Seitengruppen, die in einer Bromacetylaminooethyl-Gruppe oder in Dialdehyd-Seitengruppen enden, die zur Umsetzung mit Hämoglobin befähigt sind, und dann das die Bromacetylaminooethyl-Gruppe oder die Dialdehyd-Seitengruppen aufweisende Polysaccharid mit Hämoglobin umgesetzt wird und einen kovalent gebundenen Komplex bildet, wobei entweder die Bromacetylaminooethyl-Seitengruppen des Polysaccharids mit Mercapto-Gruppen des Hämoglobins oder die Dialdehyd-Seitengruppen des Polysaccharids mit Aminogruppen des Hämoglobins umgesetzt werden.

3. Mittel zur Verwendung als Blutersatz oder Blutstrekker zum Verabreichen an Menschen- oder Tierpatienten in Form einer wässrigen Lösung oder einer Suspension eines wasserlöslichen makromolekularen, sauerstofftransportierenden Stoffes, dadurch gekennzeichnet, daß der Stoff eine Verbindung nach Anspruch 1 ist.

Hierzu 1 Blatt Zeichnungen

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:



BLACK BORDERS

IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

FADED TEXT OR DRAWING

BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

SKEWED/SLANTED IMAGES

COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

GRAY SCALE DOCUMENTS

LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT



REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.